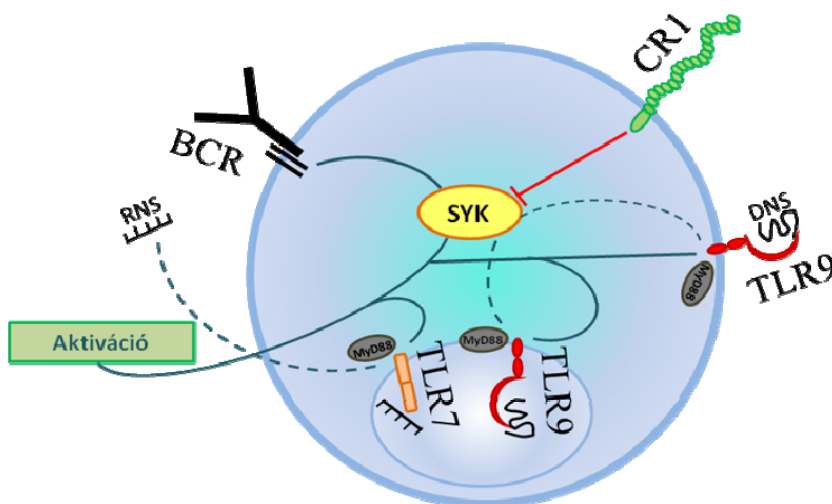


Doktori értekezés tézisei

Az emberi B-sejtek BCR-indukált aktivációját gátló 1-es típusú komplementreceptor (CR1, CD35) hatása a TLR7 és a TLR9 mediált funkciókra



Mácsik-Valent Bernadett

Témavezető:

Prof. Dr. Erdei Anna

D.Sc., egyetemi tanár
MTA rendes tagja

Biológia Doktori iskola, Immunológia Program

Programvezető:

Prof. Dr. Bajtay Zsuzsa

D.Sc., egyetemi tanár

Doktori iskolavezető:

Prof. Dr. Erdei Anna

D.Sc., egyetemi tanár
MTA rendes tagja

Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék, MTA-ELTE Immunológiai Kutatócsoport

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi kar, Budapest

2019

Bevezetés

A komplementrendszer és a Toll-szerű receptorok (TLR) két alapvető eleme a veleszületett immunitásnak, melyek nemcsak a szervezet elsődleges védelmi vonalának kialakításában játszanak kritikus szerepet, hanem az adaptív immunválasz formálásában és szabályozásában is. Bizonyos mikrobiális eredetű komponensek (ún. patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMP-ok)), továbbá a sejtek károsodásakor felszabaduló anyagok (ún. veszély-asszociált molekuláris mintázatok (DAMP-ok)), mint például a zimosán, a lipopoliszacharid (LPS) és a nukleinsavak, a megfelelő receptorokhoz kötődve szinte azonnal képesek TLR-függő jelátviteli folyamatokat indítani és ezzel egyidőben a komplementrendszert is aktiválni. Mivel a komplementkomponensek - a keringésben való jelenlétük mellett - lokálisan is termelődhetnek és aktiválódhatnak a különböző szöveti környezetekben, a C3-eredetű ligandumok könnyen elérhetőek a sejtes interakciók számára, pl. a másodlagos nyirokszervekben is. A komplementrendszer és a TLR-ek között kialakuló együttműködés jelentősen befolyásolhatja a kialakuló adaptív immunfolyamatokat.

Fiziológiás és patológias körülmények között is gyakran kerülhetnek a B-sejtek környezetébe a komplementrendszert aktiváló és a TLR-ekhez is kötődő patogének. Ilyenkor a B-sejtek felszínén expresszálandó, csírvonalban kódolt komplementreceptorok (CR) és a TLR-ek, valamint a klonálisan kifejeződő, szomatikus rekombináción átesett antigén-specifikus B-sejt receptor (BCR) egyidejű aktivációja és összjátéka alapvetően módosíthatja, vagy éppen finomhangolhatja a különböző B-sejt funkciókat.

Napjainkig a komplementrendszer és a TLR-ek együttműködésének eredménye a B-sejt funkciók szabályozásában csak kevésbé vizsgált terület¹⁻³. E két rendszer immunmoduláló hatását többnyire csak külön-külön, illetve páronként tanulmányozták (pl. TLR – BCR, CR – BCR interakciók), nem pedig egy komplex rendszer kooperáló partnereiként tekintve azokat. Kutatócsoportunk írta le először, hogy az 1-es típusú komplementreceptor (CR1, CD35) emberi B-sejtek esetében negatívan hat számos BCR-indukált sejtfunkcióra (proliferáció, citokin- és ellenanyag-termelés) fiziológiás és patológias körülmények között egyaránt^{1,4,5}. A CR1 B-sejt funkciókat gátló hatását számos további kísérletben erősítették meg mások – egyebek között *in vivo* modellrendszerekben is⁶⁻⁸.

[illegible]

Célkitűzések

Mivel a veleszületett immunrendszer működése során a B-sejtek felszínén kifejeződő CR-ek és TLR-ek az idegen anyagok és patogének szervezetbe jutásakor egyidejűleg azonnal aktiválódhatnak, annak vizsgálatát tűztük ki célul, hogy ez az esemény miként befolyásolja a B-limfociták választát. Ennek tisztázása érdekében az alábbi folyamatokat tanulmányoztuk:

1. Kutatócsoportunk korábbi munkáinak folytatásaként – melyben bizonyítottuk, hogy a CR1 gátolja az emberi B-sejtek BCR indukált funkcióit – azt vizsgáltuk, hogy a CR1 miként befolyásolja az egészséges donorokból származó B-sejtek TLR7 és TLR9 indukált funkcióit. E két TLR a patogén eredetű komponensek és a károsodott sejtekből származó nukleinsavak legismertebb szenzora.
2. Célunk volt a CR1 keresztkötés hatásának megállapítása a TLR7 és a BCR, illetve a TLR9 és a BCR egyidejű aktivációjakor bekövetkező funkcionális változások esetében is. Ezekben a kísérletekben azt az *in vivo* lejátszódó folyamatot kívántuk modellezni, amikor a komplementrendszer és a TLR-eket egyidőben aktiváló DAMP-ok vagy PAMP-ok a B-sejtek környezetébe kerülnek, ahol a BCR általi felismerésük is megtörténik.
3. A kérdések megválaszolása érdekében az alábbi B-sejt funkciókat vizsgáltuk a mandulából izolált nyugvó B-sejtek esetében:
 - sejtaktivációs markerek (CD40, CD69) megjelenése;
 - IL-6 citokin termelése;
 - sejtek osztódása;
 - sejtek IgM izotípusú ellenanyag termelése.
4. A malignus B-sejt transzformációval jellemzett CLL-ben szenvedő betegek véréből izolált B-sejtek proliferációs választ is megvizsgáltuk, az 1-es és a 2-es pontokban leírt stimulusok hatására.
5. Vizsgáltuk a CR1 általi gátlás hátterében zajló szignalizációs folyamatokat is, annak feltárása érdekében, hogy mely pont(ok)ban találkozhat a BCR és a CR1 által megindított jelátviteli út; hol érvényesülhet a komplementreceptor gátló hatása.

Alkalmazott módszerek

- B-sejtek izolálása vérből és mandulából (Ficoll gradiensen, a birka vörösvérsejttel rozettát képző sejtek eltávolításával)
- Aktivált és nyugvó B-sejt populációk elválasztása (Percoll gradiensen)
- Fluoreszcens antitesttel jelölt sejtek szortírozása (FACS Aria műszerrel)
- *In vitro* sejttenyésztés és sejtaktiválás
 - BCR-en keresztül kecske anti-humán IgG/M/A F(ab')₂ ellenanyag fragmentummal
 - TLR7-en keresztül R-837-tel
 - TLR9-en keresztül CpG ODN 2006-tal
- C3 izolálása emberi szérumból (PEG-es kicsapással, majd FPLC módszerrel)
- Áramlási citofluorimetria (FACSCalibur műszerrel)
 - Aktivációs markerek expressziójának vizsgálata
 - Intracelluláris jelátviteli molekulák foszforilációjának kimutatása PhosphoFlow technikával
- Citokintermelés mérése (ELISA módszerrel)
- Sejtproliferáció vizsgálata (3H timidin beépülés alapján)
- Ellenanyag-termelés vizsgálata (ELISPOT módszerrel)
- A Syk foszforilációjának vizsgálata (Western Blot módszerrel)

Eredmények és értékelésük

I. A CR1 (CD35) szerepe fiziológias körülmények között

1. A CR1 komplementreceptor ligandumkötése eltérő módon befolyásolja a TLR7 és a TLR9 által indukált funkciókat mandula eredetű B-limfociták esetében

Kutatócsoportunk korábbi munkájának folytatásaként – melyben bizonyítottuk, hogy a CR1 gátolja az emberi B-sejtek BCR indukált funkcióit – először azt vizsgáltuk, hogy a CR1 miként befolyásolja az egészséges donorokból származó mandula B-sejtek TLR7- és TLR9-indukált funkcióit. E két TLR a patogénekből és a károsodott sejtekből felszabaduló, veszélyt jelző nukleinsavak érzékelésében játszik fontos szerepet.

Bizonyítottuk, hogy a CR1 keresztkötése nem befolyásolja a TLR7 agonista által indukált folyamatokat – így a sejtfelszíni aktivációs markerek (CD40, CD69) megjelenését, az IL-6 citokin termelését, a proliferációt és az IgM izotípusú ellenanyagok termelését. Ezzel szemben a TLR9-en keresztül ható CpG által kiváltott minden fenti aktivációs folyamatot szignifikánsan gátol a CR1-hez kötődő, C3-eredetű komplement-ligandum.

Ezen megfigyelésünk a CR1 és a TLR7, illetve a CR1 és a TLR9 között kialakuló kölcsönhatás eltérő mechanizmusára, valamint a különböző TLR-ekhez kötődő PAMP-ok és DAMP-ok eltérő biológiai szerepére hívja fel a figyelmet a humorális immunválasz kialakulása során.

2. A TLR7 és a BCR, illetve a TLR9 és a BCR együttes stimulációjának hatására kialakuló szinergisztikus sejtválaszokat a komplement-eredetű ligandum mindkét TLR esetében szignifikánsan gátolja

Modellezve azt az *in vivo* lejátszódó folyamatot, amikor a komplementrendszer és a TLR-eket egyidőben aktiváló DAMP-ok vagy PAMP-ok a B-sejtek környezetébe kerülnek – ahol a BCR általi felismerésük is megtörténik –, kísérleteinkben a mandula eredetű sejteket a TLR7 vagy TLR9 agonista jelenléte mellett a BCR-en keresztül is aktiváltuk, a komplement-eredetű ligandum jelenlétében és anélkül is.

Az összes általunk vizsgált sejtfunkció, azaz a sejtfelszíni aktivációs markerek (CD40, CD69) megjelenése, az IL-6 citokin termelése, a proliferáció, valamint az IgM izotípusú ellenanyagok termelése esetében is azt tapasztaltuk, hogy erőteljesen érvényesül a komplementreceptor gátló hatása, tehát a nagymértékű szinergisztikus aktivációt a CR1 mindkét TLR esetében szignifikánsan blokkolta.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az in vivo is lejátszódó folyamat, vagyis a veleszületett immunrendszer fontos elemeinek – komplement és TLR-agonisták – jelenléte és egyidejű aktivációja döntően befolyásolja a humorális immunválaszt biztosító B-sejtek antigénkötő receptora által kiváltott alapvető funkcióit.

II. A CR1 (CD35) szerepe patológiás körülmények között

1. A CR1 keresztkötésével kiváltott TLR9 gátlás B-sejt tumor (CLL) esetében is érvényesül

Fontosnak tartottuk megvizsgálni a CR1, a TLR-ek és a BCR között kialakuló párbeszéd következményeit patológiás körülmények között tumorossá fajuló B-sejtek esetében is, mivel itt különösen fontos szerepe lehet a CR1 sejtosztódást gátló hatásának. Vizsgálatainkat CLL-ben szenvedő betegek véréből izolált B-sejteken végeztük el, osztódási képességüket mérve.

Eredményeink azt mutatják, hogy a kórosan felszaporodott CD5⁺ B-sejtek sem a BCR-stimulusra, sem a TLR7-en keresztül történő stimulációra nem válaszoltak jelentős mértékben, viszont a CpG általi aktiváció a sejtek erős proliferációját váltotta ki. Ez utóbbi, TLR9-indukált osztódási választ a CR1 keresztkötése az egészséges donorok B-sejtjei esetében mérthez hasonlóan, nagyon hatékonyan gátolta.

A CR1 hatást vizsgáló kísérletekbe bevont betegek B-sejtjei viszont kisebb mértékű proliferációval válaszoltak a TLR9 és a BCR egyidejű stimulációjára, mint a csak TLR9-et aktiváló agonistára, mely jelenség valószínűleg a betegek mutálatlan IgV_H státuszával hozható összefüggésbe¹¹. Meglepetésünkre, a CR1 keresztkötése a megfigyelt osztódási választ nem befolyásolta. Ennek oka lehet az, hogy ezekben a mutálatlan nehézlánccal rendelkező sejtekben a BCR-indukált szignalizáció megváltozott, továbbá lehetséges az is, hogy a CpG-közvetített intracelluláris folyamatok szintén eltérnek a normál B-sejtektől. A folyamat hátterében álló molekuláris mechanizmus feltáráshoz további kísérletek elvégzése szükséges.

Eredményeink igazolják a CR1 és a TLR9 közötti együttműködés adaptív immunfolyamatok modulációjában betöltött fontos szerepét patológiás körülmények között is. Továbbá felhívják a figyelmet a CR1 terápiás célponként történő alkalmazásának lehetőségére, mivel a TLR9-indukált osztódás hatékony gátlását igazoló eredmények alapján a CR1 „célzásával” a jövőben megvalósíthatóvá válhat a tumorossá fajult B-sejtek kóros osztódásának szuppressziója is.

III. A CR1 gátlásának háttérében álló jelátviteli folyamatok

1. A Syk BCR-indukált foszforilációját a CR1 keresztükötése gátolja

Annak feltárása érdekében, hogy mely pont(ok)ban találkozhat a BCR és a CR1 által megindított jelátviteli út; hol érvényesülhet a komplementreceptor gátló hatása, vizsgáltuk a CR1 általi gátlás háttérében zajló szignalizációs folyamatokat vérből és mandulából izolált B-sejtek esetében egyaránt. Feltételeztük, hogy a CR1 egy olyan szignalizációs molekulára hatva fejti ki gátló funkcióját, mely közös eleme a BCR- és a TLR9-indukált jelátviteli útvonalaknak, viszont független a TLR7-hez kapcsolódó intracelluláris eseményektől.

Kimutattuk, hogy a Syk tirozin-kináz BCR-en keresztül kiváltott foszforilációja a CR1 keresztükötése által jelentős mértékben gátolható a vér és a mandula eredetű B-sejtek esetében is. Ezen jelátviteli molekuláról bizonyított, hogy amellet, hogy kitüntetett szereppel bír a BCR-indukált szignalizációban¹², hozzájárul a sejt felszínen megkötött CpG intracelluláris TLR9-ekhez történő szállításához is¹³. Azonban nincs arra vonatkozó adat, hogy a TLR7 jelátvitelében is részt venne.

Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a CR1 gátló hatása a BCR- és a TLR9-függő jelátviteli lépések közös pontjánál, a Syk tirozin-kináznál érvényesül, az enzim foszforilációjának gátlása révén. Továbbá azt gondoljuk, hogy a CR1 a kettős, TLR7 + BCR stimulus hatására kialakuló szinergisztikus mértékű sejt választ a BCR-indukált Syk aktiváció szupressziója révén csökkenti.

Eredményeinket összegezve tehát bizonyítottuk, hogy a CR1 (CD35) fontos szerepet játszik a TLR- és a TLR + BCR függő fiziológiás és patológiás B-sejt funkciók szabályozásában egyaránt. A ligandum megkötését követő erős gátló hatása révén a CR1 lehetséges terápiás célpont nem csak autoimmun betegek esetében (ahogy ezt korábban bizonyítottuk), hanem a B-sejtes tumorok esetében is, ahol a CR1 „célzásával” gátolható lehet a sejtek kóros osztódása.

Összefoglalás

A B-sejtek környezetében gyakran jelenhetnek meg a komplementrendszer és a különböző TLR-eket egyidejűleg aktiváló mikrobiális komponensek - PAMP-ok - vagy károsodott sejtekből felszabaduló veszélyt jelző szignálok - DAMP-ok. Feltételezhető, hogy e két veleszületett érzékelőrendszer elemei között kialakuló interakció fontos szerepet játszik a B-sejtek válaszában szabályozásában. Mindaddig azonban ezeket többnyire külön entitásként tekintették, együttműködésük hatását nem vizsgálták. A mi kutatócsoportunk bizonyította először, majd mások is megerősítették különböző rendszerekben, hogy a CR1 (CD35) nagyon hatékony inhibitora az emberi B-sejtek BCR-függő aktivációjának.

Hogy még közelebb kerüljünk az említett rendszerek közötti együttműködés részleteinek megértéséhez, a dolgozatban bemutatott munkánk céljaként tűztük ki annak vizsgálatát fiziológias és patológias körülmények között egyaránt, hogy a CR1 miként befolyásolja az emberi B-sejtek - leginkább tanulmányozott PAMP és DAMP szenzoraiként ismert - TLR7 és TLR9 indukált funkcióit. Emellett modellezve azokat a körülményeket, amikor a komplementrendszer és a TLR-eket egyaránt aktiváló DAMP-ok vagy PAMP-ok B-sejtek környezetébe jutnak, feltártuk a CR1 keresztkötésének következményeit a TLR7 és a BCR, illetve a TLR9 és a BCR egyidejű aktivációjakor bekövetkező funkcionális változásokra is.

Kimutattuk, hogy a CR1 keresztkötése szignifikánsan és dóziszfüggően csökkenti a B-sejtek TLR9-indukált aktivációs marker expresszióját, citokintermelését, proliferációját és ellenanyag-termelését, viszont nincs hatással a TLR7-indukált funkciókra. A TLR7 és a BCR, illetve a TLR9 és a BCR együttes stimulációjára kialakuló szinergisztikus választ azonban szignifikánsan gátolja a komplement-eredetű ligandum. Patológias körülmények között, CLL B-sejtek esetében is bizonyítottuk a CR1 gátló hatását a TLR9 indukált osztódási folyamatra.

Igazoltuk továbbá vér és mandula eredetű B-sejtek esetében is, hogy a CR1 keresztkötése csökkenti a BCR indukált Syk foszforilációt, ami arra utal, hogy a receptor inhibitor hatását már a B-sejt aktiváció kezdeti jelátviteli szakaszában kifejti.

Eredményeink alapján arra lehet következtetni, hogy amikor a komplementet és TLR-eket is aktiváló PAMP-ok vagy DAMP-ok jelen vannak a B-sejtek környezetében, akkor a CR1 és a TLR7, valamint a CR1 és a TLR9 között kialakuló kooperáció az emberi B-sejtek szabályozásának egy újabb szintjét biztosítja, mely fiziológias és patológias körülmények közt egyaránt fontos.

Az értekezés alapját képező saját közlemények:

Bernadett Mácsik-Valent, Katinka Nagy, László Fazekas, Anna Erdei

Complement Receptor Type 1 (CR1, CD35), the Inhibitor of BCR-Mediated Human B Cell Activation, Differentially Regulates TLR7, and TLR9 Induced Responses

Frontiers in Immunology, 10 (2019) 1493. doi: 10.3389/fimmu.2019.01493. IF: 6.429

Bernadett Mácsik-Valent, Mariann Kremlitzka, Zsuzsa Bajtay, Judit Demeter, Csaba Bodor, Anna Erdei

Functional studies of chronic lymphocytic leukemia B cells expressing beta2-integrin type complement receptors CR3 and CR4

Immunology Letters, 189 (2017) 73-81. doi: 10.1016/j.imlet.2017.05.016. IF: 2.463

Mariann Kremlitzka, Bernadett Mácsik-Valent, Anna Polgár, Emese, Gyula Poór, Anna Erdei

Complement Receptor Type 1 Suppresses Human B Cell Functions in SLE Patients

Journal of Immunology Research, (2016) 5758192. doi: 10.1155/2016/5758192 IF: 2.63

Anna Erdei, Noémi Sándor, Bernadett Mácsik-Valent, Szilvia Lukácsi, Mariann Kremlitzka, Zsuzsa Bajtay

The versatile functions of complement C3-derived ligands

Immunological Reviews, 274 (2016)127-140. doi: 10.1111/imr.12498. IF: 5.57

Mariann Kremlitzka, Bernadett Mácsik-Valent, Anna Erdei

Regulation of B cell functions by Toll-like receptors and complement

Immunology Letters. 178 (2016) 37-44. doi: 10.1016/j.imlet.2016.07.015. IF: 2.86

Egyéb közlemények:

Anna Erdei, Szilvia Lukácsi, Bernadett Mácsik-Valent, Zsuzsa Nagy-Baló, István Kurucz, Zsuzsa Bajtay

Non-identical twins: Different faces of CR3 and CR4 in myeloid and lymphoid cells of mice and men.

Seminars in Cell & Developmental Biology, 85 (2017) 110-121.

doi: 10.1016/j.semcdb.2017.11.025. IF: 6.138

Mariann Kremlitzka, Bernadett Mácsik-Valent, Anna Erdei

Syk is indispensable for CpG-induced activation and differentiation of human B cells.

Cellular And Molecular Life Sciences, 72(11) (2015) 2223-2236.

doi: 10.1007/s00018-014-1806-x. IF: 5.694

Össz-impakt faktor: **31.684**

Idézett irodalom

- 1 Jozsi, M., Prechl, J., Bajtay, Z. & Erdei, A. Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes. *Journal of immunology* **168**, 2782-2788 (2002).
- 2 Fischer, W. H. & Hugli, T. E. Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *Journal of immunology* **159**, 4279-4286 (1997).
- 3 Rubtsov, A. V. *et al.* Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c(+) B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood* **118**, 1305-1315, doi:10.1182/blood-2011-01-331462 (2011).
- 4 Kremlitzka, M. *et al.* Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a potent inhibitor of B-cell functions in rheumatoid arthritis patients. *International immunology* **25**, 25-33, doi:10.1093/intimm/dxs090 (2013).
- 5 Kremlitzka, M. *et al.* Complement Receptor Type 1 Suppresses Human B Cell Functions in SLE Patients. *Journal of immunology research* **2016**, 5758192, doi:10.1155/2016/5758192 (2016).
- 6 Voynova, E. *et al.* An antibody-based construct carrying DNA-mimotope and targeting CR1(CD35) selectively suppresses human autoreactive B-lymphocytes. *Immunology letters* **116**, 168-173, doi:10.1016/j.imlet.2007.12.016 (2008).
- 7 Kerekov, N. S. *et al.* Elimination of autoreactive B cells in humanized SCID mouse model of SLE. *European journal of immunology* **41**, 3301-3311, doi:10.1002/eji.201141439 (2011).
- 8 Manoylov, I. K., Boneva, G. V., Doytchinova, I. A., Mihaylova, N. M. & Tchorbanov, A. I. Protein-engineered molecules carrying GAD65 epitopes and targeting CD35 selectively down-modulate disease-associated human B lymphocytes. *Clinical and experimental immunology* **197**, 329-340, doi:10.1111/cei.13305 (2019).
- 9 Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors. *Current protocols in immunology* **109**, 14 12 11-14 12 10, doi:10.1002/0471142735.im1412s109 (2015).
- 10 Mansson, A., Adner, M., Hockerfelt, U. & Cardell, L. O. A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation. *Immunology* **118**, 539-548, doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02392.x (2006).
- 11 Chatzouli, M. *et al.* Heterogeneous functional effects of concomitant B cell receptor and TLR stimulation in chronic lymphocytic leukemia with mutated versus unmutated Ig genes. *Journal of immunology* **192**, 4518-4524, doi:10.4049/jimmunol.1302102 (2014).
- 12 Dal Porto, J. M. *et al.* B cell antigen receptor signaling 101. *Molecular immunology* **41**, 599-613, doi:10.1016/j.molimm.2004.04.008 (2004).
- 13 Kremlitzka, M., Macsik-Valent, B. & Erdei, A. Syk is indispensable for CpG-induced activation and differentiation of human B cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **72**, 2223-2236, doi:10.1007/s00018-014-1806-x (2015).